



EP/03/7963

Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 11 NOV 2003

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industrial**

N. **MI2002 A 001620**



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**Inoltre verbale depositato alla Camera di Commercio di Milano n. MIR002472 del 12/09/2002 (pag. 1)
Atto di Designazione degli Inventori (pag. 1).**

Roma, il **25.06.2003**

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
Dr.ssa Paola Giuliano

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **NOVUSPHARMA S.p.A.** codice **04376350150**
 Residenza **Bresso (Milano)**
 2) Denominazione **ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI** ED
 Residenza **Milano** codice **04376350155**

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome **Bianchetti Giuseppe ed altri** cod. fiscale
 denominazione studio di appartenenza **Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.**
 via **Rossini** n. **8** città **Milano** cap **20122** (prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via n. città cap (prov)

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci) gruppo/sottogruppo

"Composto ad attività antitumorale"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA / /

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) 3)
 2) 4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) 2) / / /

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **12** PROV n. pag. **17**
 Doc. 2) **12** PROV n. tav. **06**
 Doc. 3) **10** X RIS
 Doc. 4) **10** X RIS
 Doc. 5) **10** RIS
 Doc. 6) **10** RIS
 Doc. 7) **10**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura **XXXXXXXXXXXX**

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

Duecentonovantuno/80#

8) attestati di versamento, totale Euro

COMPILATO IL **23/07/2002**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO **NO**

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI **MILANO**

MILANO

codice **1515**

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 001620

Reg. A.

L'anno **DUEMILADUE**

, il giorno **VENTITRE**

, del mese di **LUGLIO**

il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda corredata da **00** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL RAPPRESENTANTE È INFORMATO DEL CONTENUTO DELLA CIRCOLARE N.423 DEL 13/02/2001 E SOTTOSCRIVE IL DEPOSITO CON

RISERVA DI LETTERA DI INCARICO

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE

M. CORTONESI

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 001620

REG. A

DATA DI DEPOSITO

23/07/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

"Composto ad attività antitumorale"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso del composto (E)-1,3-diidro-5,6-dimetossi-3-[(4-idrossifenil)metilene]-2H-indol-2-one per il trattamento di tumori in cui sono coinvolte le proteine ad attività tirosinchinasica Met, PDGF-R, FGF-R, Kit e oncoproteine della famiglia Ret.

M. DISEGNO

Attività antitumorale del composto 1
sul carcinoma midollare della tiroide TT xenotraspiantato

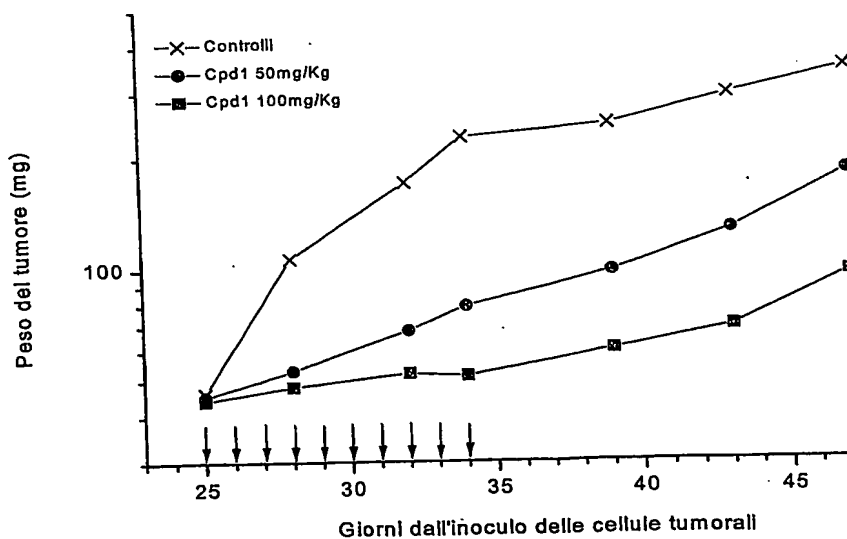


Fig 3



36 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

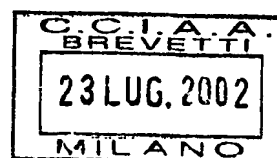
3/mc **"COMPOSTO AD ATTIVITA' ANTITUMORALE"**

a nome : 1. NOVUSPHARMA S.p.A.;

MI 2002 A 0 0 1 6 2 0

**2. ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA
DEI TUMORI**

con sede in : 1. Bresso (Milano); 2. Milano



* * *

La presente invenzione riguarda l'uso del composto (E)-1,3-diidro-5,6-dimetossi-3-[(4-idrossifenil)metilene]-2H-indol-2-one per il trattamento di tumori in cui sono coinvolte le proteine ad attività tirosinchinasica Met, PDGF-R, FGF-R, Kit e oncoproteine della famiglia Ret (recettori costitutivamente attivi a seguito di mutazione).

STATO DELLA TECNICA

Gli oncogeni RET/PTC sono espressi principalmente nei tumori papillari della tiroide e derivano da riarrangiamenti cromosomici somatici in cui è coinvolto il gene proto-RET. La proteina Ret/ptc1 è una proteina di fusione prodotta dall'oncogene RET/PTC1, che origina dal riarrangiamento del dominio tirosin-chinasico del gene (normale) proto-RET con il gene H4/D10S170. I prodotti di tali geni riarrangiati sono caratterizzati da attività tirosin-chinasica indipendente dal ligando e localizzazione citoplasmatica.

In Int. J. Cancer 85, 384-390 (2000) si descrive l'effetto di inibizione dell'attività tirosin-chinasica dell'oncoproteina Ret/ptc1 da parte di derivati a struttura arilidene-2-indolinonica. Tra i composti maggiormente attivi viene citato l'1,3-diidro-5,6-dimetossi-3-[(4-idrossifenil)metilene]-2H-indol-2-one (di seguito composto 1), che è in grado di ripristinare il fenotipo normale in

cellule NIH3T3 trasformate dall'oncoproteina Ret/ptc1. Nello stesso articolo viene proposto l'impiego degli inibitori di tirosin-chinasi della classe degli ariliden-2-indolinoni nello studio del signaling di Ret e nel controllo della proliferazione cellulare in patologie associate a Ret e Ret/ptcs.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Si è ora trovato che il composto 1 inibisce efficacemente proteine ad attività tirosin-chinasica, diverse da ret/ptc1, che hanno un ruolo importante nell'insorgenza, progressione e diffusione dei tumori. In particolare il composto 1 si è dimostrato in grado di inibire completamente l'autofosforilazione delle tirosinchinasi Ret/MEN2A (mutC634R), Ret/MEN2B (mutM918T), Met, PDGF-R, FGF-R e Kit, di ridurre l'espressione (down-regolazione) e di revertire il fenotipo di cellule trasformate dalle stesse.

Oggetto dell'invenzione è pertanto l'uso del composto 1,3-diidro-5,6-dimetossi-3-[(4-idrossifenil)metilene]-2H-indol-2-one, o dei suoi sali con basi farmaceuticamente accettabili, per il trattamento di tumori in cui è coinvolta almeno una delle tirosinchinasi Met, PDGF-R, FGF-R, Kit o almeno un'oncoproteina della famiglia Ret, in particolare Ret/MEN2A e Ret/MEN2B, nella fase iniziale di trasformazione cellulare o nei successivi stadi di proliferazione e diffusione tumorale.

Le oncoproteine Ret recanti le mutazioni C634R o M918T - che provocano l'attivazione costitutiva dei recettori - si riscontrano nelle sindromi MEN2A e rispettivamente MEN2B. L'inibizione delle stesse è utile nel trattamento dei tumori midollari della tiroide, nel feocromocitoma e nella iperplasia delle paratiroidi. A differenza dei tumori papillari della tiroide i

tumori midollari hanno un comportamento aggressivo.

L'attività inibitoria su Met è utile nella terapia coadiuvante volta a ridurre l'invasività dei tumori di origine epiteliale. In relazione ad alterazioni attivanti di Met, il composto 1 può avere una specifica indicazione nella terapia medica dei tumori renali.

L'inibizione di Kit trova applicazione nel trattamento di tumori stromali del tratto gastro-enterico (GIST), nei tumori polmonari a piccole cellule e in alcune forme di leucemie.

L'attivazione non controllata ed il coinvolgimento in "loops" autocrini del PDGF-R lascia prevedere l'impiego terapeutico del composto-1 in alcuni tipi tumorali non responsivi alle terapie convenzionali, quali i gliomi.

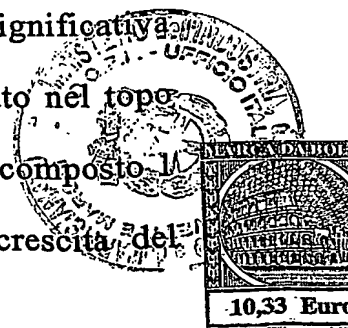
Inoltre, l'impiego del composto 1 è utile nel trattamento di melanomi in cui si ha un'elevata espressione di FGF-R e del rispettivo ligando bFGF. Poiché tale recettore ha un ruolo importante anche nella neoangiogenesi, la sua inibizione suggerisce un possibile contributo terapeutico attraverso l'inibizione della vascolarizzazione del tumore.

Per i previsti impieghi terapeutici, il composto 1, in forma libera o salificata, potrà essere formulato con veicoli ed eccipienti farmaceuticamente accettabili. I sali del composto 1 sono ottenuti per salificazione della funzione fenolica con opportune basi organiche o inorganiche farmaceuticamente accettabili. Le composizioni farmaceutiche saranno in forma idonea alla somministrazione orale, parenterale, sublinguale o transdermica, preferibilmente in forma di compresse, capsule, granuli, polveri, sciroppi, soluzioni, sospensioni, supposte, forme a rilascio controllato.

Queste preparazioni farmaceutiche possono essere prodotte con metodiche tradizionali usando ingredienti noti nella tecnica farmaceutica. Anche se il dosaggio può variare in base alla gravità della malattia, all'età del paziente, al tipo e via di somministrazione, generalmente si utilizzerà una quantità compresa tra 0,1 e 1000 mg/Kg, preferibilmente tra 5 e 300 mg/Kg, ancora più preferibilmente 20 e 200 mg/kg, in dose singola o multipla, per una o più volte al giorno.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Le oncoproteine Ret/MEN2A e Ret/MEN2B sono prodotte dal gene RET portatore, rispettivamente, delle mutazioni C634R e M918T. Entrambe le oncoproteine sono coinvolte nella patologia molecolare del carcinoma midollare della tiroide. Le mutazioni causano attivazione costitutiva ma non modificano la localizzazione cellulare (a livello di membrana) del recettore. L'inibizione da parte del composto 1 è stata documentata in cellule murine trasfettate con il gene RET/MEN2A e nelle linee cellulari umane di carcinoma midollare della tiroide TT e MZ-CRC-1 caratterizzate rispettivamente dall'espressione di Ret/MEN2A (C634R) e Ret/MEN2B (M918T) (Figure 1,2). In questi sistemi cellulari la riduzione della fosforilazione in tirosina delle oncoproteine si accompagna ad una diminuzione della loro espressione. A livello cellulare l'inibizione dell'autofosforilazione di Ret/MEN2A e Ret/MEN2B è associata ad un effetto antiproliferativo a concentrazioni farmacologicamente rilevanti. Infatti, è stata documentata una significativa attività antitumorale nel trattamento del tumore TT xenotrapiantato nel topo nudo; una somministrazione orale giornaliera di 50-100 mg/kg di composto 1 (due volte al giorno) causava una inibizione dell'80% nella crescita del



tumore senza segni di tossicità (Fig. 3). L'evidenza biochimica e farmacologica dell'efficacia del composto 1 nel controllo della proliferazione di cellule di carcinoma midollare della tiroide è di particolare rilevanza per possibili implicazioni terapeutiche, poiché tali tumori sono aggressivi e non controllati dalle convenzionali terapie farmacologiche.

Il recettore dell'HGF, Met, è una tirosin-chinasi coinvolta nel processo invasivo tipico della progressione tumorale e della metastatizzazione. Alterazioni quali mutazioni, coinvolgimento in loops autocrini ed iperespressione causano una attivazione costitutiva deregolata della chinasi. La deregolazione dell'attività chinasica di Met è implicata nella capacità invasiva di molti tumori di origine epiteliale. Nei carcinomi papillari della tiroide Met è frequentemente iperespresso. I risultati (Fig. 4) documentano una completa inibizione dell'autofosforilazione di Met in cellule TPC-1 trattate con il composto 1.

Altri recettori con attività tirosin chinasica, quali PDGF-R e FGF-R, hanno un ruolo rilevante nella crescita neoplastica, poiché sono coinvolti sia in loops autocrini della cellula tumorale sia nel processo neoangiogenico. La rilevanza dell'attivazione non controllata di questi recettori è documentata in tumori refrattari alla terapia convenzionale, quali i gliomi ed i melanomi. I risultati, illustrati nella Fig. 5, documentano una inibizione dose-dipendente dell'attività autofosforilante indotta dal corrispondente fattore di crescita (ligando specifico) associata ad una riduzione dell'espressione del recettore. L'effetto è particolarmente marcato sulla fosforilazione del PDGF-R poiché a concentrazioni maggiori di 15 μ M, l'inibizione è completa e accompagnata da una down-regolazione della proteina stessa.

Kit è una tirosin chinasi costitutivamente attivata a seguito di mutazioni o coinvolgimento in loops autocrini in vari tipi tumorali quali i tumori polmonari a piccole cellule (SCLC), i tumori stromali del tratto gastro-intestinale (GIST), seminomi, leucemie. Anche in questo caso, il composto 1 inibisce l'autofosforilazione di Kit (mutato $\Delta 559$). La Figura 6 mostra l'inibizione completa ottenuta alla concentrazione di 20 μM . Tale inibizione si riflette sulla morfologia di cellule transfettate con lo stesso oncogene, che mostrano reversione del fenotipo trasformato.

I risultati sono illustrati in maggior dettaglio nelle Figure allegate.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Fig. 1. Effetto del composto 1 in fibroblasti NIH3T3 trasfettati con l'oncogene RET/MEN2A (mut C634R). A) Le cellule NIH3T3^{MEN2A(C634R)} sono state esposte alla concentrazione 10 μM del composto 1 per i tempi indicati. Al termine del trattamento lo stato di fosforilazione del recettore è stato analizzato in estratti proteici totali mediante Western Blotting. I filtri sono stati incubati con anticorpo anti-fosfotirosina (pTyr) e successivamente reibridati con anticorpi anti-Ret. Dopo due ore di trattamento con il farmaco la fosforilazione del recettore appariva parzialmente inibita. A tempi di esposizione superiori, una completa inibizione dell'autofosforilazione si accompagnava ad una ridotta espressione del recettore stesso. B) I fibroblasti murini NIH3T3 e la linea transfettata NIH3T3^{MEN2A(C634R)} sono stati esposti a concentrazioni crescenti del composto 1 per 72 ore. Le curve di sopravvivenza, ottenute dopo conta cellulare mostrano la maggiore sensibilità della linea cellulare esprimente l'oncoproteina. C) Le fotografie mostrano la reversione del fenotipo morfologico trasformato delle cellule NIH3T3^{MEN2A}

(C634R) in presenza del composto 1 (6 μ M) dopo 24 ore di trattamento.

Fig. 2. Effetto del composto 1 in cellule umane di carcinoma midollare della tiroide TT esprimenti l'oncoproteina Ret/MEN2A (C634R) e MZ-CRC-1 esprimenti l'oncoproteina Ret/MEN2B (M918T). A) Le cellule sono state trattate per 24 ore con il composto 1 alle concentrazioni indicate. I lisati cellulari sono stati analizzati mediante la tecnica Western Blotting. L'esposizione al farmaco induceva una riduzione dose-dipendente della fosforilazione in tirosina delle proteine Ret/MEN2A e Ret/MEN2B come evidenziato dal blot anti-fosfotirosina. La successiva incubazione con anticorpo anti-Ret mostrava una riduzione dell'espressione del recettore alla concentrazione più alta dell'inibitore. B) Le cellule TT e MZ-CRC-1 sono state trattate con concentrazioni crescenti del composto 1 per 7 giorni e successivamente contate. Le curve dose-risposta documentano la capacità del composto 1 di interferire con il potenziale proliferativo delle cellule di carcinoma midollare della tiroide.

Fig. 3. Attività antitumorale del composto 1 sul carcinoma midollare della tiroide TT xenotrapiantato in topi atimici. Il trattamento è stato iniziato al giorno 25 dopo l'inoculo delle cellule tumorali con due somministrazioni al giorno per via orale di 50 o 100 mg/kg in 5% etanolo, 5% cremophor ELP, 90% soluzione fisiologica come veicolo di somministrazione. Il trattamento, protratto per 10 giorni consecutivi come indicato dalle frecce, ha indotto una inibizione dose-dipendente della crescita del tumore.

Fig. 4. Inibizione dell'autofosforilazione di Met in cellule TPC-I trattate con il composto 1. Immunoprecipitati anti-Met ottenuti da cellule di controllo (-), o esposte a composto 1 alla concentrazione 60 μ M per 72 ore

(+), sono stati risolti mediante SDS-elettroforesi, trasferiti su nitrocellulosa e sottoposti ad immunoblotting mediante gli anticorpi anti-pTyr o anti-Met. Le frecce indicano le due catene della proteina Met di 170 e 145 KDa. La fosforilazione in Tyr della catena di 145 KDa risulta abolita dal trattamento.

Fig. 5. Inibizione dell'autofosforilazione di PDGF-R e FGF-R indotta dai rispettivi ligandi in fibroblasti Swiss 3T3 trattati con il composto 1. Le cellule sono state incubate in presenza dell'inibitore, alle concentrazioni indicate, per 18 h. Dopo stimolazione con PDGF o bFGF 1 nM per 5 min, i lisati cellulari sono stati sottoposti a Western blotting, come descritto nei metodi. In alto, il blot anti-pTyr mostra l'inibizione dose-dipendente causata dal composto 1 dell'autofosforilazione di PDGF-R. L'inibizione è completa alle concentrazioni 30 μ M e 60 μ M. A queste concentrazioni, nel blot anti-PDGFR, si osserva anche una parziale inibizione dell'espressione del recettore. In basso, il blot anti-pTyr mostra l'inibizione dose-dipendente, causata dal composto 1, dell'autofosforilazione di FGF-R. L'inibizione è completa alla concentrazione 60 μ M. Il blot anti-FGFR mostra che, a questa concentrazione, anche l'espressione del recettore è ridotta. In entrambi i casi, il blot anti-actina serve da controllo per il caricamento proteico dei diversi campioni.

Fig. 6. Reversione del fenotipo morfologico trasformato e inibizione dell'autofosforilazione di kit (Δ 559) in transfettanti NIH3T3^{Kit(Δ 559)} trattati con il composto 1 alla concentrazione 20 μ M per 72 ore. In alto, le fotografie mostrano il cambiamento morfologico delle cellule esposte al composto che, simili a fibroblasti normali, presentano maggiore adesione alla piastra, forma più allungata e una disposizione più ordinata rispetto alle cellule di



controllo (-). In basso, lisati cellulari ottenuti da cellule di controllo (-), o trattate con composto 1 20 μ M (+) sono stati risolti mediante SDS-elettroforesi, trasferiti su nitrocellulosa e sottoposti a immunoblotting con gli anticorpi anti-pTyr o anti-Kit. La freccia indica la forma matura di Kit fosforilata in tirosina. La fosforilazione è abolita dal trattamento.

METODI

Linee cellulari e mantenimento in coltura

Sono state utilizzate in questo studio le seguenti linee cellulari umane di carcinoma papillare della tiroide: NPA, K1, TPC-1 (quest'ultima caratterizzata dall'espressione dell'oncoproteina Ret/ptc1); le linee cellulari umane TT e MZ-CRC-1 derivano da carcinomi midollari della tiroide e presentano rispettivamente il gene RET con mutazione C634R, riscontrata nella sindrome MEN2A, e la mutazione M918T tipica della sindrome MEN2B.

Sono stati inoltre utilizzati i fibroblasti murini SWISS3T3 e NIH3T3 e le seguenti linee cellulari ottenute per trasfezione delle cellule NIH3T3 con differenti oncogeni: NIH3T3^{PTC-1}, NIH3T3^{MEN2A (C634R)}, NIH3T3^{KIT (A559)}.

Le cellule TPC-1, NPA ed MZ-CRC-1 sono mantenute in DMEM con 10% siero fetale (FCS); la linea cellulare K1 in DMEM: Ham's F12: MCDB 104 (2: 1: 1) con aggiunta di 10% FCS. Le cellule Nthy-ori 3-1 richiedono come medium RPMI 1640 addizionato di FCS al 10% e le cellule TT necessitano di un terreno di coltura costituito da Ham's F12 e 15% FCS.

DMEM addizionato del 10% di calf serum (Colorado Serum Company, Denver, CO) è necessario per il mantenimento in coltura dei fibroblasti murini SWISS3T3 e NIH3T3, mentre per le linee trasfettate derivate dalle cellule NIH3T3 è richiesto il 5% di calf serum.

Tutte le linee cellulari umane e le cellule SWISS3T3 sono incubate in un'atmosfera al 5% di CO₂ mentre i fibroblasti NIH3T3 e le linee transfettate al 10% di CO₂.

Anticorpi

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali: anti-fosfotirosina clone 4G10 e anti-FGF-R della Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY. Sono stati inoltre utilizzati i seguenti anticorpi policlonali di coniglio: anti-Ret che riconosce la sequenza COOH-terminale (aa 1000-1014) comune alle due isoforme di Ret; anti-c-Kit, anti-h-Met della Santa Cruz Biotechnology; anti-actina della Sigma, St. Louis, MO e anti-PDGFR A7B della Upstate Biotechnology.

Immunoprecipitazione e Western Blotting

Per gli esperimenti di immunoprecipitazione, le cellule di controllo e quelle trattate con il farmaco venivano processate secondo il protocollo precedentemente descritto (Int. J. Cancer 85:384-390, 2000).

Brevemente, le cellule venivano lavate con tampone fosfato freddo PBS (Phosphate Buffer Saline) addizionato di sodio ortovanadato 0,1 mM e quindi lisate mantenendole su ghiaccio per 20 minuti in un tampone così costituito: 50 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% Glicerolo, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM sodio pirofosfato, 10 µg/ml antipaina, 10 µg/ml pepstatina, 20 µg/ml chimostatina, 10 µg/ml E64, 1 mg/ml pefabloc SC (inibitori di proteasi della Roche Diagnostics, Italia). Dopo eliminazione dei detriti grossolani mediante centrifugazione i campioni venivano normalizzati in base al contenuto proteico e quindi incubati con l'anticorpo opportuno in presenza di proteina A coniugata all'agarosio (Sigma, St. Louis,

MO). Gli immunocomplessi venivano quindi sottoposti a lavaggi con 20 mM HEPES, pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% Glicerolo, 0,1% Triton X-100 e le proteine erano eluite in un tampone costituito da: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 5% β -mercaptoetanolo, 0,001% blu di bromofenolo.

Per la preparazione di estratti cellulari totali, le cellule venivano lisate utilizzando un tampone di lisi con la seguente composizione: 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2% SDS, 10% glycerolo, 5% β -mercaptoetanolo, 0.001% blu di bromofenolo con aggiunta di 1 mM PMSF, 10 μ g/ ml pepstatina, 12,5 μ g/ml leupeptina, 100 KIU aprotinina, 1 mM sodio ortovanadato, 1 mM sodio molibdato.

Le proteine degli immunoprecipitati e degli estratti cellulari totali venivano quindi separate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrane di nitrocellulosa. Dopo ibridazione con gli anticorpi primari, i filtri venivano incubati con gli anticorpi secondari di topo o di coniglio coniugati alla perossidasi. Le bande immunoreattive erano poi evidenziate utilizzando il sistema chemiluminescente ECL Amersham Biosciences (Amersham, United Kingdom) o Pierce (Rockeford, IL):

Inibizione della proliferazione cellulare

Dopo 3 o 7 giorni di trattamento le cellule erano tripsinizzate e contate con l'ausilio di un Coulter Counter (Coulter Electronics, Luton U.K.). Le IC₅₀ erano calcolate dalle curve dose-risposta.

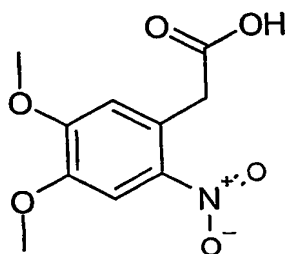
Valutazione dell'attività antitumorale

Il tumore midollare della tiroide TT è stato inoculato sotto cute in topi atimici (17×10^6 cellule/topo). Il trattamento farmacologico è stato iniziato per via orale dopo 25 giorni con due somministrazioni al giorno di dosi di 50 o 100 mg per 10 giorni in 5% etanolo, 5% cremophor ELP, 90% soluzione

fisiologica come veicolo di somministrazione. L'effetto antitumorale è stato valutato in termini di inibizione della crescita del tumore, attraverso misura del peso del tumore con la formula $TW (mg) = d^2 \times D / 2$ in cui d e D sono i diametri minore e maggiore del tumore.

Preparazione dell'1,3-diidro-4-idrossibenziliden-5,6-dimetossi-(1H) - indol-2-one.

1) Sintesi dell'acido 2-nitro-4,5-dimetossifenilacetico.



$C_{10}H_{11}NO_6$, M.W. 241,20

Sotto atmosfera di N_2 e sotto agitazione meccanica, l'acido 3,4-dimetossifenilacetico (45g, 0,23 moli, 1 eq.) è stato sciolto in acido acetico glaciale a $28^\circ C - 35^\circ C$, (100 mL, 2,2 volumi). La soluzione è stata raffreddata a $15^\circ - 20^\circ C$ e, ad essa, una miscela di acido nitrico fumante (98%, 33 mL) in acido acetico glaciale (25 mL) è stata aggiunta in 45'. A fine aggiunta si osserva precipitazione di un solido rosso. La sospensione è stata versata in H_2O e ghiaccio (600 mL) e tenuta sotto agitazione per 2h. Il solido è stato filtrato, lavato con H_2O , essiccato a $60^\circ C$ per 8h. Si sono ottenuti 44g, di prodotto desiderato.

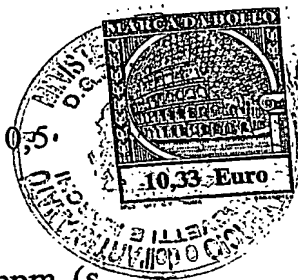
Resa 79,3% (mmoli/moli)

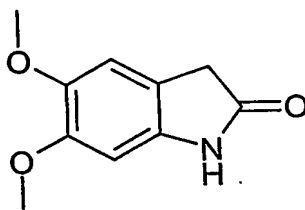
Tlc (SiO_2 ; Etile Acetato 10/AcOH 0,5) $Rf_{acido} = 0,6$; $Rf_{prodotto} = 0,5$.

p.f. $199^\circ - 202^\circ C$

1H -NMR, (DMSO): 3,9 ppm (s, 6H); 4.0 ppm (s., 2H); 7,12 ppm (s.,

1H); 7,7 ppm (s., 1H).



2) Sintesi dell'1,3-diidro-5,6-dimetossi-(1H)-indol-2-one $C_{10}H_{11}NO_3$, M.W. 193,11

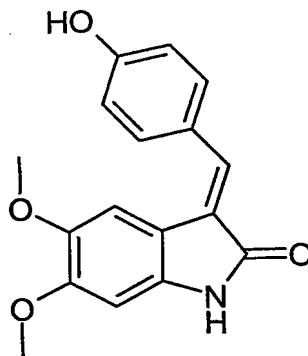
Sotto atmosfera di N_2 e sotto agitazione meccanica, l'acido 3,4-dimetossi-2-nitro-fenilacetico, (9,2 g, 38,14 mmoli, 1 eq.) è stato sospeso in acido acetico glaciale (92 mL, 10 volumi), a $25^\circ C$. Alla sospensione è stato aggiunto Fe^0 in polvere, 325 mesh, 97%, (12g, 214,86 mmoli, 5,6 eq.) in due porzioni uguali: la prima porzione a t.a. La miscela è stata scaldata a riflusso e dopo 30' è stata aggiunta la seconda porzione di Fe^0 . Dopo 30' la reazione è risultata completa, TLC (SO_2 ; $CHCl_3$ 9/MeOH 1), R_f nitro = 0,65, R_f indolinone = 0,71.

La sospensione grigia è stata raffreddata a temperatura ambiente, l'acido acetico è stato evaporato a pressione ridotta, fino ad ottenere un solido grezzo. Il solido è stato sospeso in cloroformio (200mL), i sali sono stati filtrati e la fase organica è stata lavata con soluzione satura di NaCl (100mL), seccata su Na_2SO_4 ed evaporata a secco. Il solido è stato sospeso in etere etilico (35mL) per 30', filtrato e seccato in stufa a $50^\circ C$ per 2h. Si sono ottenuti 6,7g di solido beige.

Resa 90,9% (mmoli/mmoli)

p. f. 199° - $201^\circ C$

1H -NMR, (DMSO): 3,4 ppm (s., 2H); 3,69 ppm (s., 3H); 3,72 ppm (s., 3H); 6,49 ppm (s., 1H); 6,92 ppm (s., 1H); 10,15 ppm (s., 1H).

3) Sintesi di (E)-1,3-diidro-4-idrossibenziliden-5,6-dimetossi-1H-indol-2-one $C_{17}H_{15}NO_4$, M.W. 297,31

Il 1,3-diidro-5,6-dimetossi-(1H)-indol-2-one, (6,7g, 36,9 mmoli, 1eq.) è stato sciolto in DMSO anidro (50 mL), a temperatura ambiente. Alla soluzione, sono stati aggiunti 4-idrossibenzaldeide (5,41g, 44,3 mmoli, 1,2 eq.) e piperidina (4,38g, 44,3 mmoli, 1,2eq.). La miscela è stata tenuta sotto agitazione per 16h. La miscela è stata versata in H₂O (250mL) e HCl 0,5N (150mL). Si osserva precipitazione di un solido che è stato raffreddato a 5°-10°C per 1h, filtrato ed essiccato sotto vuoto a 80°C, per 2h. Si sono ottenuti 13 g di solido umido che sono stati cristallizzati da etanolo assoluto, ottenendo 6,77g di prodotto.

Resa 61,6% (mmoli/mmoli)

p.f. 238°-240°C

R_f (Silice; Etile Acetato 100%) = 0,68

¹H-NMR, (DMSO): 3,6 ppm (s., 3H); 3,8 ppm (s., 3H); 6,5 ppm (s., 1H); 6,9 ppm (d., 2H, J = 8,6 Hz); 7,25 ppm (s., 1H); 7,38 ppm (s., 1H); 7,6 ppm (d., 2H, J = 8,6 Hz); 10 ppm (broad s.); 12,8 ppm (s.).

La stereochimica E del doppio legame esociclico in posizione 2 è stata attribuita sulla base di esperimenti 1D NOE NMR.

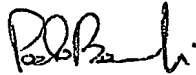
RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica contenente come principio attivo il composto 1,3-diidro-5,6-dimetossi-3-[(4-idrossifenil)metilene]-2H-indol-2-one (composto 1) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 in forma idonea alla somministrazione orale o parenterale.
3. Uso del composto 1 per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di tumori in cui è coinvolta almeno una tirosinchinasi scelta tra Met, PDGF-R, FGF-R, Kit o almeno un'oncoproteina della famiglia Ret.
4. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di tumori esprimenti le oncoproteine Ret/MEN2A e Ret/MEN2B.
5. Uso secondo la rivendicazione 4, dove detti tumori sono tumori della tiroide, feocromocitoma e iperplasia delle paratiroidi.
6. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di tumori in cui è presente un'alterazione attivante di Met.
7. Uso secondo la rivendicazione 6, per il trattamento dei tumori renali.
8. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di tumori esprimenti Kit costitutivamente attivato per mutazione o coinvolgimento in loop autocrino.
9. Uso secondo la rivendicazione 8, dove detti tumori sono tumori stromali del tratto gastro-enterico, tumori polmonari a piccole cellule e leucemie.
10. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di tumori in cui è coinvolta l'attivazione incontrollata di PDGF-R.
11. Uso secondo la rivendicazione 10, per il trattamento dei gliomi.
12. Uso secondo la rivendicazione 3, per il trattamento di tumori ad elevata espressione di FGF-R e/o del suo ligando bFGF.

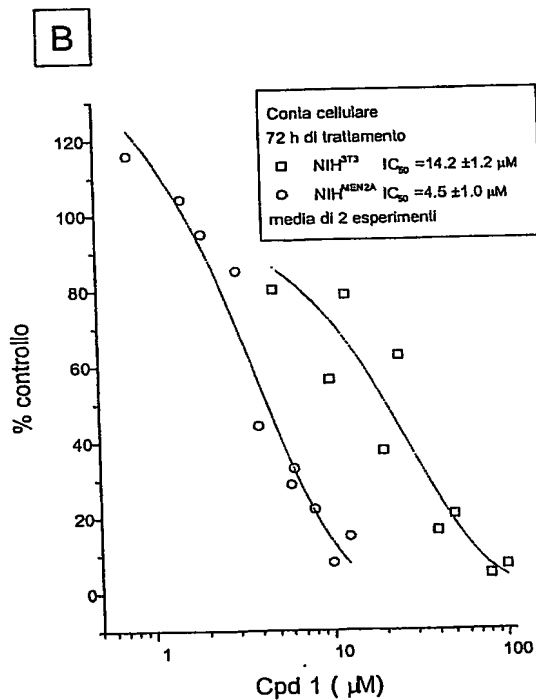
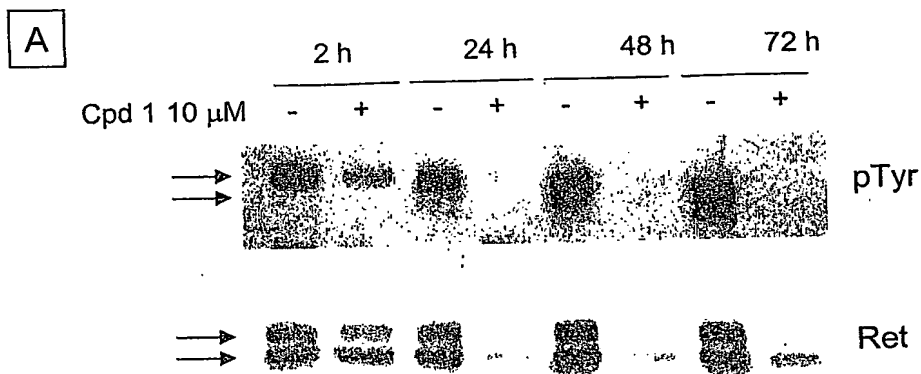
13. Uso secondo la rivendicazione 12, per il trattamento dei processi neoangiogenici tumorali.

Milano, 23 luglio 2002

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



Effetto del Composto 1 su Ret/MEN2A in cell. NIH3T3^{MEN2A}(C634R)



C MI 2002A 001620

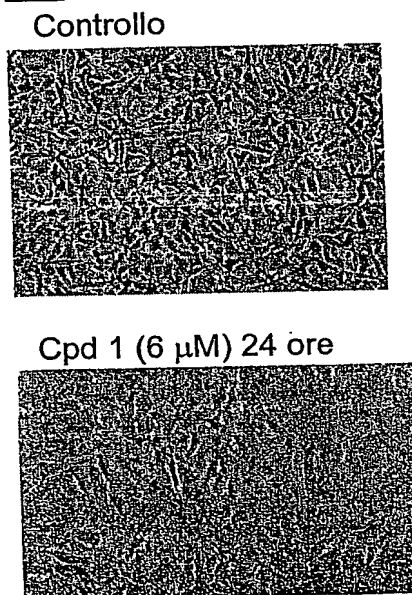


Fig 1

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Paolo Banfi



Effetto del Composto 1 in cellule di carcinoma midollare della tiroide

A



B

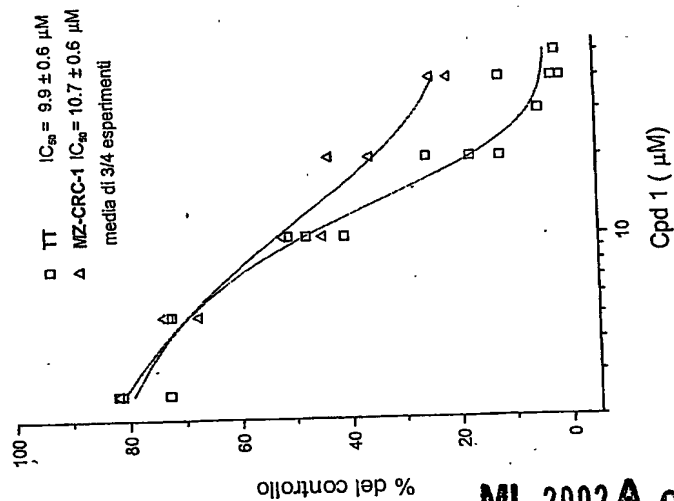


Fig 2

MI 2002A 0 0 1 6 2 0

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Banfi Paolo



Attività antitumorale del composto 1
sul carcinoma midollare della tiroide TT xenotrapiantato

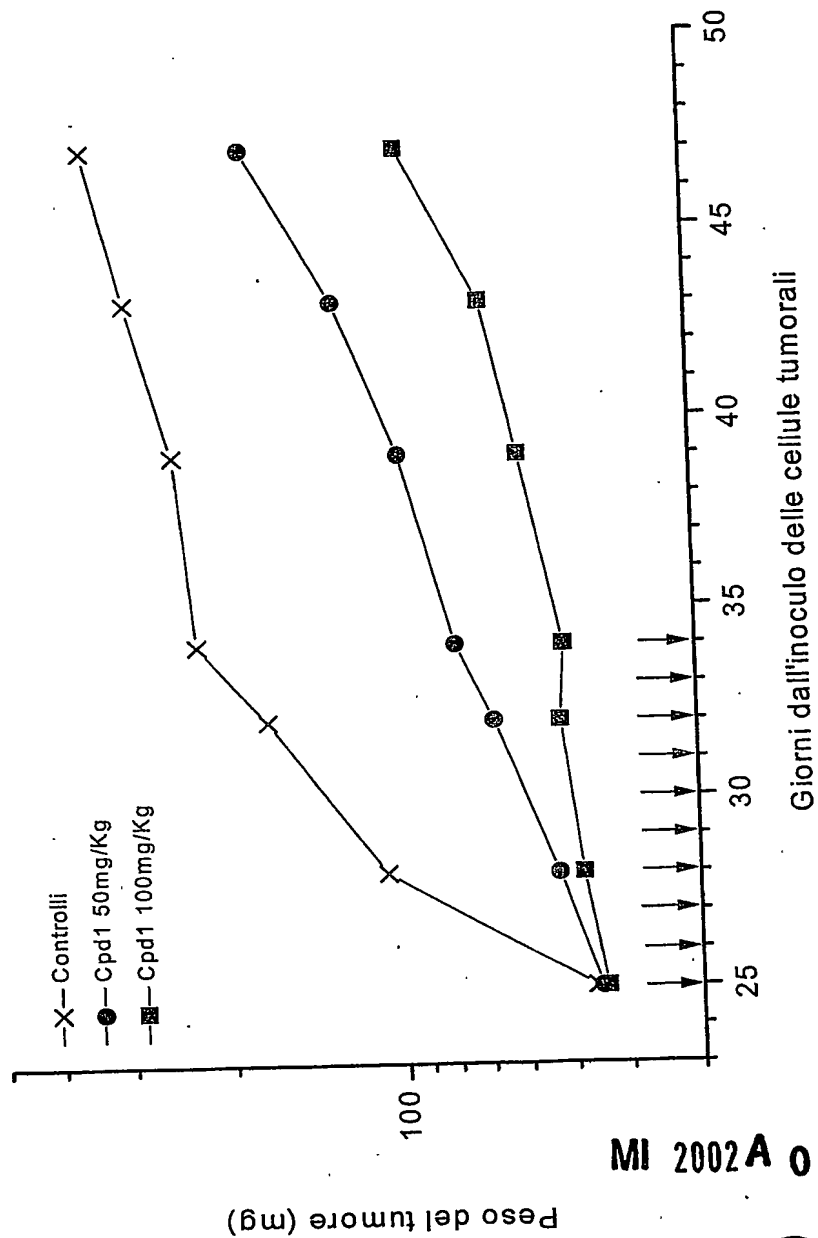


Fig 3

MI 2002A 001620

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo Banfi



Inibizione del recettore tirosin-chinasi Met nella linea di carcinoma papillare della tiroide TPC-1

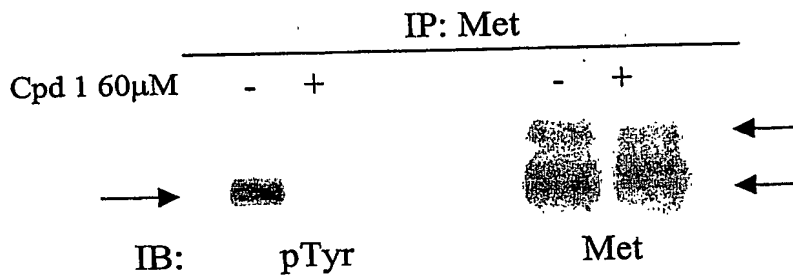
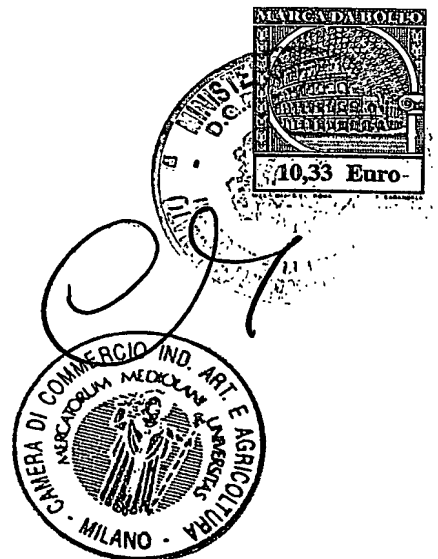


Fig 4

MI 2002A 001620

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature of Banfi Paolo



Inibizione dei recettori tirosin-chinasi PDGFR e FGFR

PDGFR

Cpd 1 (μ M) - - 7.5 15 30 60

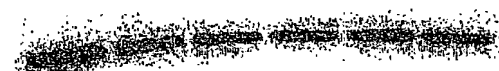
PDGF - + + + + +



pTyr



PDGFR



actina

FGFR

Cpd 1 (μ M) - - 7.5 15 30 60 μ M

bFGF - + + + + +



pTyr



FGFR



actina

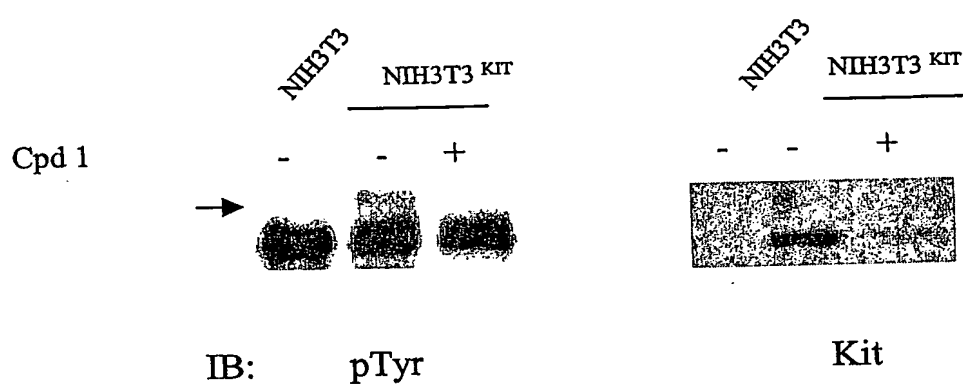
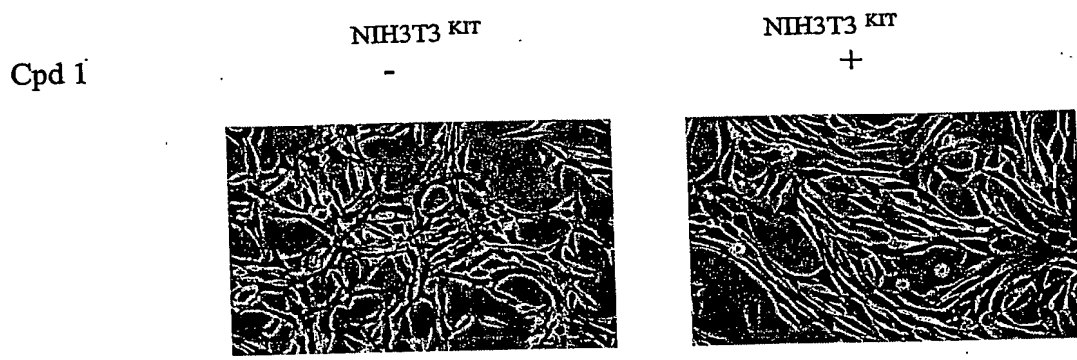
MI 2002A 001620

Fig 5

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



Inibizione di Kit



MI 2002A 001620

Fig 6

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Mipoja S.r.l.

Handwritten signature





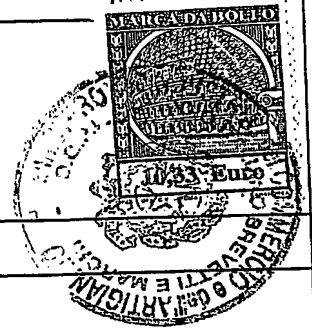
CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA DI MILANO

Documenti a seguito di riserve - Reg. R

Data consegna	Protocollo riserva	Richiedente
12 settembre 2002		1. NOVUSPHARMA S.p.A. Bresso (Milano) 2. ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI Milano

Rappresentante del Richiedente
Bianchetti Giuseppe
Bracco Mauro
Bianchetti Marina
Minoja Fabrizio
Vergani Maria Fiorella
Banfi Paolo
Fabio Francesco

Rif. No. Domanda	Data presentazione domanda
MI2002A 001620	23 luglio 2002
Invenzione X Modello Marchio	



Oggetto del seguito
1. Atto di designazione inventori.
2. N. 2 lettere d'incarico.

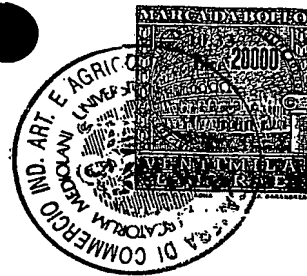


Il Depositante

L'Ufficiale Rogante

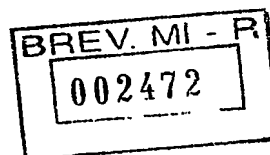
M. PETRALIA

ATTO DI DESIGNAZIONE DEGLI INVENTORI



I sottoscritti Signori Bianchetti Giuseppe ed altri di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l. (vedi lettera d'incarico), Via Rossini, 8 - Milano, mandatari delle Società **NOVUSPHARMA S.p.A.**, con sede a Bresso (Milano) e **ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI**, con sede a Milano

dichiarano



che gli inventori della domanda di brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

"Composto ad attività antitumorale"

depositata in data 23 luglio 2002 al No. MI2002A 001620



sono i Signori:

- **Lanzi Cinzia**
- **Cassinelli Giuliana**
- **Cuccuru Giuditta**
- **Pierotti Marco Alessandro**
- **Zunino Franco**
- **Menta Ernesto**



Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Banfi Paolo

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.